模擬 GM 大油菜與小油菜之雜交後代的鑑別

洪鴻 [1]、林子凱 [2]、杜元凱 [3]、郭寶錚 [1,*]
[1] 國立中興大學農藝學系
[2] 行政院農業委員會農業試驗所作物組
[3] 行政院農業委員會農業試驗所生技組

摘要

油菜的基因改造(genetically modified; GM)技術在 1990 年初期開始應用於大油菜(*Brassica napus*)，有許多重要的農藝性狀相關基因，已經藉由基因改造技術轉入大油菜品系之中。GM 作物所造成的基因流動除對田區雜草管理上產生問題外，亦可能影響生態環境或作物的產銷。有許多因素會對基因流動產生不同的影響，因此對於預測或是預防基因流動有其困難性。本篇利用自大陸地區引進的商業上推廣種植 *B. napus* 品種模擬 GM 大油菜，以及臺灣地區常見的小油菜(*B. rapa*)品種，在溫室種植並進行 *B. napus* 及 *B. rapa* 間人工雜交，取得雜交後代種子。並利用 SRAP (sequence-related amplified polymorphism)之技術，配合流式細胞儀(Flow CytoMetry; FCM)分析細胞核酸含量，輔以外表性狀之觀察，用來鑑別雜交後代種子。結果發現，後代外表型有傾向大油菜的現象，經流式細胞儀分析雜交後代細胞內核酸含量，發現含量位於兩親本之間；SRAP 分析的部分，從 30 組引子組合當中選擇了 7 組引子組合作為分析之用，在雜交後代中至少有 5 個可供鑑別的條帶。最後利用試驗結果對田間自然授粉之種子進行分析，發現無論是基因型或外表型的分析結果，均與人工雜交種子的結果一致。這些結果可應用於監測田間所種植的小油菜是否有被 GM 大油菜花粉所汙染。

關鍵詞：小油菜、大油菜、相關序列增幅多型性、流式細胞儀。

Identifying the F_1 hybrids of the Simulated GM *Brassica napus* and *Brassica rapa*

Hong Hong[1], Tzu-kai Lin[2], Yuan-kai Yu[2] and Bo-Jein Kuo[1,*]

[1] Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung City 40227, Taiwan ROC
[2] Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City 41362, Taiwan ROC
[3] Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City 41362, Taiwan ROC

ABSTRACT

The technology of genetically modified (GM) of Brassica oilseed started from *Brassica napus* in the early 1990s. There are a number of genes related to the important agronomic traits which have been transferred into rapeseed lines by GM technology. Gene flow results in not only weed management problems, but also influences the ecological environment or crops production in the field. The gene flow could be affected by many factors, so the prediction or prevention of gene flow was very difficult. In this study, we employed a *B. napus* species, which is a commercial variety used to simulate the GM oilseed rape in Mainland China, and a *B. rapa* species, which is green manure species in Taiwan. All materials were planted in a greenhouse and

* 通信作者, bjkuo@nchu.edu.tw
投稿日期：2016 年 3 月 3 日
接受日期：2016 年 4 月 24 日
作物、環境與生物資訊 13:53-66 (2016)
Crop, Environment & Bioinformatics 13:53-66 (2016)
189 Chung-Cheng Rd., Wufeng District, Taichung City 41362, Taiwan ROC

then implemented the crossing experiments to produce hybrid seeds. In order to confirm the observation of the difference between parents and their offspring, the sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular maker and the flow cytometric (FCM) were used to analyze them. As results indicated, phenotypes of hybrids were more close to *B. napus* and the DNA content of hybrids was between that of their parents. In the SRAP study, seven primer pairs from thirty SRAP primer pairs to analyze the hybrids. It was found that there were at least five polymorphic molecular markers could be used to identify hybrids. Finally, a real field-level experiment was employed to confirm that the results of hybrid seeds from artificial and open-pollination are the same. These results could be used to monitor whether *B. rapa* in the field has been contaminated by the GM *B. napus*.

Key words: *Brassica rapa*, *Brassica napus*, Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), Flow CytoMetry (FCM).

前言

蕓薹屬(*Brassica*)起源於亞洲及地中海地區，最早紀錄出現於印度(Colton and Potter 1999)，約 100 個種，種類繁多，包含多倍體和單倍體，可當蔬菜、調味和榨油用，近年來更被應用於生物燃料。常見如油菜(*B. napus* L., *B. rapa* L.)、甘藍(*B. oleracea* L. Gemmifera)、結球白菜(*B. rapa* L. Pekinesis)、小白菜(*B. rapa* L. Chinensis)等皆屬於蕓薹屬作物(Nagaharu 1935)。油菜為異交作物，花粉型態上屬蟲媒花，但兼具風媒花的輕小和蟲媒花易附著的特性，花粉也可能隨風飄散數公里之遠(Treu and Emberlin 2000)。

人類自古以來即不斷地進行作物的育種工作，在作物的育種上始終遵照植物自然的遺傳行為進行。傳統雜交育種是利用人為篩選出的植株經人工雜交數代後，藉著染色體在雜交過程中的自然產生重組情形，接著利用外表型性狀選拔出特定的特性，並經多代的持續選拔以確保性狀穩定後，育出所需要的品種(Cellini *et al.* 2004)。近年因分子技術的進步，可以將外來的基因片段，利用基因轉殖技術轉移至目標植物染色體組中進行育種(Hansen and Wright 1999)。

基因工程是指利用科學的方式操縱，修改生物體內的遺傳物質 DNA，使生物特性改變，將新創造或其他物種 DNA 中的遺傳片段轉入欲改良的物種，以產生新的特性或品種。基因工程在作物的方面，則是利用微生物或其他生物的特性以改進作物的抗病性、抗蟲性及對除草劑的抗性。這些經過基因工程改造後的作物，被稱為基因改造作物(genetically modified crops; GM crops) (Uzogara 2000)。

由於生物技術的進步，全球 GM 作物已快速的商業化及大規模被種植，但也引起全球對於生物安全及食物安全性的重視，擔心基因改造作物是否會對環境、周遭動植物甚至人類造成影響(Gasson 2000)。在生物安全方面，以種子繁殖的作物在收穫的時候會有一些種子落入田野間，而造成 GM 作物種子在落入田野間之後是否會與野生近緣種、栽培種或是雜草發生雜交的疑慮，尤其在澳洲地區油菜被視為主要的田野間雜草(Groves *et al.* 2003)。GM 作物種子落入田野間並產生 GM 作物後代後，GM 作物之特性是否會因為與當地自生族群(volunteer)雜交，而使當地原有的自生族群產生與 GM 作物相同的特性，影響當地的生物相及生態系統，導致生態的破壞，遂成為大眾關注的議題。

GM 作物對於野生族群所造成的影響已有許多人關注，而對於如何抑制 GM 作物所造成的基因流動，雖然已經有如應用無融生殖(apomixis)、自交不親和性、利用化學誘導或刪除轉基因等方式，但到目前為止，仍然沒有一個有效的方式可來抑制所有物種與 GM 作物雜交的可能性(Daniell 2002)。基因流動(gene flow)指族群間的基因或等位基因的轉移，在植物中基因流動可能透過花粉飄

散或是種子傳播，而基因流動是造成於非GM田區的植株遭到GM作物污染的主要原因。因此，在GM和非GM作物之雜交後代對環境、對生物的影響利弊確定之前，先行規範GM作物的種植，以及有效分辨GM和非GM作物的雜交後代，實有其必要性。

目前油菜的基因改造技術已臻成熟，許多重要的農藝性狀已藉由基因改造技術，將調控農藝性狀的相關基因轉移入油菜品系之中。例如，抗除草劑、抗蟲性、抗病性，改變種子中的油分和蛋白質成分的比例與含量，改變次級代謝產物的生產量，以及植株的產量或生育特性等，這也大幅的增加了蕓薹屬作物間的遺傳多樣性。第一個商業化油菜品種是由Voelker等研究者，將California bay tree的基因構築在cDNA上，然後轉殖進入油菜，產生高月桂酸(lauric acid, C12:0)含量之品種(Wang *et al*. 2005)。

在澳洲地區油菜被視為主要的田野間雜草，因此GM油菜所造成的基因流動，除對田區雜草管理上產生問題外，亦可能影響生態環境或作物的產銷。在雜草管理上，田間近緣種雜草如與GM油菜雜交，由於獲得對除草劑具抗性的基因而可能成為超級雜草，對田間之雜草管理和作物的生長競爭產生極大威脅。而這些超級雜草，亦可能直接影響當地生態圈及改變動植物相。基因流動可經由花粉、種子或營養繁殖在作物間自然發生，另有許多因素會對基因流動產生不同的影響，例如風向、風速、氣溫、作物間的花期及GM與非GM作物花粉相對濃度等，因此造成預測或預防基因流動的困難(Weekes *et al*. 2007)。根據FitzJohn *et al.* (2007)試驗結果得知，臺灣冬季裡作普遍種植的*B. rapa*和主要榨油*B. napus*之間雜交成功情形較其他物種高(FitzJohn *et al.* 2007)，是可供研究探討的材料。

植物外表型性狀易受環境影響，而造成判斷是否發生雜交上的困難，因此可以直接利用分子標誌來鑑別基因組間的差異。隨著分子生物技術的進步，許多新的分子標誌出現，並被廣泛應用於親緣鑑定、基因定位和分子輔助選拔(marker-assisted selection; MAS)等研究(Schlötterer 2004)。

分子標誌種類眾多，本研究將以SRAP (sequence-related amplified polymorphism)為主要的應用技術。SRAP分子標誌多型性的產生，主要由於品種間在intron或編碼區(coding region)核酸序列發生插入、缺失或核苷酸變異而導致。其操作過程具有簡單快速操作的優點，在PCR產物的分析上可使用聚丙醯胺膠體電泳分析或以2%瓊酯膠體電泳分析。本研究利用自大陸地區引進*B. napus*品種「德雜油18號」模擬GM大油菜，以及臺灣當地常在冬季裡作種植的*B. rapa*品種「農興80天」做為試驗材料。於溫室種植並進行人工授粉，取得人工雜交後代後，以流式細胞儀(Flow CytoMetry; FCM)分析親代和子代的染色體倍數性，並以SRAP分析後代和親代間的基因組多型性，找出足以辨別後代是否有雜交的多型性條帶。同時也將進行植株外表性狀的觀察，比對親本與子代的外觀，探討兩者間的差異性。再於田間種植，模擬在自然環境下雜交種子與人工雜交種子是否有一致的分析結果，這些結果可應用於監測田間所種植的小油菜是否有被GM大油菜花粉所汙染。

材料與方法

一、試驗材料

本試驗所使用的試驗材料，包括由大陸地區所蒐集的*B. napus*品種「德雜油18號」(隱性細胞核雄不稔之兩系雜交品種)和臺灣地區常見的*B. rapa*品種「農興80天」。*B. napus*原生長於溫帶地區，臺灣地區氣候屬於熱帶及副熱帶氣候，為確保*B. napus*在臺灣的環境下可以正常開花，故將所蒐集到的*B. napus*種子播種於培養皿內，待發芽後，放入4℃冰箱中30–40 d左右，進行春化處理，春化期間幼苗置於全暗環境。為使開花期相

近，在 *B. napus* 春化處理結束時，*B. rapa* 同時進行育苗工作。將前述工作完成後，隨之將所有參試材料種植於 128 孔穴盤中，待長出 4 片本葉後，取其葉片用於抽取 genomic DNA，作為 SRAP marker 篩選用之材料以及與後代比對之親代樣本。

此外，由每個品種中選出較為健壯的植株，移到盆栽內栽植，待植株進入開花期時進行人工授粉，以產生雜交後代種子。為增加雜交之成功率，所有雜交組合皆採用蕾期授粉法，也就是就各植株選擇花苞尚未開放之花枝先行套袋。待位於下位之花開之後，打開套袋並收集下位花的花粉，再將未成熟花苞中的雄蕊剔除，並將父本品種之花粉直接蘸至雌蕊的柱頭上面。然後，再套袋 1 wk 之後，再將套袋移除俾使果莢正常發育。選擇約 3 到 5 串花串進行雜交試驗，待果莢成熟後收集雜交 F_1 種子，種植之後萃取葉片之 genomic DNA 用以進行 SRAP 分析比對之用。

二、雜交子代之外表型觀察

將雜交子代與相對應的雜交親本種植於盆栽之中，等植株成長至約 4、5 片葉齡時，將雜交子代與兩親本植株的葉片進行比較，包括: 葉片外緣平滑或是呈波浪狀、葉片是否呈現革質情形、葉片顏色及葉片基部裂葉的有無等特徵的比較。

三、Genomic DNA 之萃取

採集親代各取 30 株植株及各雜交組合 F_1 取 4 株植株的葉片，進行 DNA 之萃取，依據 Doyle and Doyle (1987) CTAB 加以修改應用。取約 100 mg 鮮嫩葉片以液態氮磨成粉末狀後，加入 600 µL 65℃ extraction buffer [2% (w/v) CTAB、1.4 M NaCl 、20 mM EDTA 、100 mM Tris-HCl, pH 8.0、1% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP) 、 2% (v/v) β-mercaptoethanol]。混合均勻之後放入 65℃水浴槽，每 10 min 混合搖勻一次，共 40 min。於室溫冷卻 1–2 min 之後加入 600 µL Chloroformisoamyl alcohol [24 : 1 (v/v)]，上下劇烈搖晃 200 次以上，以 4℃ 10,000 rpm 離心機離心 6 min。吸取上清液，後加入等體積的冰 isopropanol，緩慢上下混合均勻至 DNA 析出。以 4℃ 10,000 rpm 離心機離心 10 min，倒去上清液之後以 70% 酒精潤洗。倒去酒精之後置於 65℃烘箱烘乾，加入 50 µL TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0)，置於 65℃水浴槽回溶。待 DNA 完全溶解，以 2%之瓊酯膠體(agarose gel)電泳和分光光度計量測 260 nm/280 nm、280 nm 評估 DNA 的品質和濃度，隨後放-20℃之冰箱存放。

四、以 SRAP 分析樣本及 PCR 反應

使用的 SRAP 引子序列，參考 Li and Quiros (2001) 的研究中所使用的 5 個 forward 和 6 個 reverse 共 30 組引子進行增幅(Table 1)，藉由"CCGG"在 exon 以及"AATT"在 intron 和 promoter 較高的出現機率，能增幅出更多的多型性條帶(Li and Quiros 2001)。在 PCR 反應部分，以 DNA 濃度 4 ng μL^{-1} 的樣本進行反應，總體積為 25 µL，反應中含 2.5 µL 10× PCR buffer、2.0 µL 2.5 µM dNTPs、1.5 µL forward and reverse primer、0.5 µL Takara Ex Taq polymerase、2.0 µL 2.5 µM $MgCl_2$ 及 6.5 µL dH_2O。反應置於 PCR 儀中進行，反應條件為 94℃ 5 min；接著 94℃ 1 min，35℃ 1 min，72℃ 1 min，循環 5 次。再以 94℃ 1 min，50℃ 1 min，72℃ 2 min，循環 35 次，最後一次循環則以 72℃ 10 min 做最後延展，反應完成後以 4℃保存。

將反應完成後的溶液，加入 5 µL 6× loading dye 混和，並以 2.0%的瓊酯膠體進行電泳分析。先以 50 V 之電壓進行 30 min 電泳，接著再以 100 V 之電壓進行 210 min 的電泳。經 EtBr (ethidium bromide)染色後在 UV 燈下觀察膠體上條帶呈現，並照相存檔作為後續分析之用。

引子組合將由一個 forward 搭配一個 reverse 構成一個引子組合，如 me 1 將分別與 em 1– em 6 組成 6 組引子組合、me 2 也將分別和 em 1– em 6 組成 6 組引子組合，以此類推，共計有 30 種不同的組合進行樣本分析，引子組合 me 5–em 6 將以 5-6 表示；引子組合 me 1–em 1 則將以 1-1 表示。為了不使親代及雜交後代的多型性判斷上產生誤判，因此使用在品種間可呈現具顯著差異且肉眼可清晰判斷的多型性條帶的引子組合進行試驗。本試驗選擇了 1-5、2-6、3-5、3-6、5-1、5-3、5-6 等七組引子組合，供親本及子代與親本差異性的多型性分析中使用 (Table 1)。

進一步以選獲的 SRAP 分析品種的多型性，每個品種預計選擇 30 個樣本進行分析，分別在結果膠圖上編號 1–30，分析種內與品種間的歧異度，以期找出可區分不同品種之多型性。在子代部分，將人工雜交所得到的子代樣本，各雜交組合取 4 株植株，進行與親代相同之分析，並將分析結果與父母本植株的多型性相比較，觀察是否與所對應的親代出現相同的多型性。

五、雜交子代分析方法

在前述的親本分析試驗中，在親本之中挑選 4 個樣本，作為之後判斷雜交子代的依據。因為親本品種內的基因型本身存在差異，所以挑選的 4 個親本，會包含在親本分析試驗中 30 個樣本出現的所有多型性條帶，以防止在子代的時候發生誤判。

試驗時以 4 個母本、父本及子代的樣本同時進行 SRAP 分析，利用親代多型性的差異和子代比較，先假設子代如果沒有發生雜交，則呈現的多型性條帶應會與母本相同。但因為雜交的關係，所以子代會帶有父本的多型性條帶。因此，若在子代多型性條帶中，產生了母本沒有而父本擁有的多型性條帶，即可視為此條帶是由父本基因組所增幅產生的條帶，並判斷此子代樣本為雜交子代，並以此觀察條帶呈現判斷是否發生雜交。如 Fig. 1 所示，圖中用橫線段表示增幅出的多型性條帶，母本的任何一個樣本如果出現子代

Table 1. Example of forward primers and reverse primers used in SRAP analysis.

Primer name	No.	Sequence (5′-3′)	Forward/reverse
HMK2007-95	me 1	5′ - TGA GTC CAA ACC GGA TA -3′	SRAP primer-F
HMK2007-96	me 2	5′ - TGA GTC CAA ACC GGA GC -3′	SRAP primer-F
HMK2007-97	me 3	5′ - TGA GTC CAA ACC GGA AT -3′	SRAP primer-F
HMK2007-98	me 4	5′ - TGA GTC CAA ACC GGA CC -3′	SRAP primer-F
HMK2007-99	me 5	5′ - TGA GTC CAA ACC GGA AG -3′	SRAP primer-F
HMK2007-100	em 1	5′ - GAC TGCGTA CGA ATT AAT -3′	SRAP primer-R
HMK2007-101	em 2	5′ - GAC TGCGTA CGA ATT TGC -3′	SRAP primer-R
HMK2007-102	em 3	5′ - GAC TGCGTA CGA ATT GAC -3′	SRAP primer-R
HMK2007-103	em 4	5′ - GAC TGCGTA CGA ATT TGA -3′	SRAP primer-R
HMK2007-104	em 5	5′ - GAC TGCGTA CGA ATT AAC -3′	SRAP primer-R
HMK2007-105	em 6	5′ - GAC TGCGTA CGA ATT GCA -3′	SRAP primer-R

Note: in this study, primer pairs me5–em 6 shoe as 5-6, and primer pairs me 1–em 1 show as 1-1.

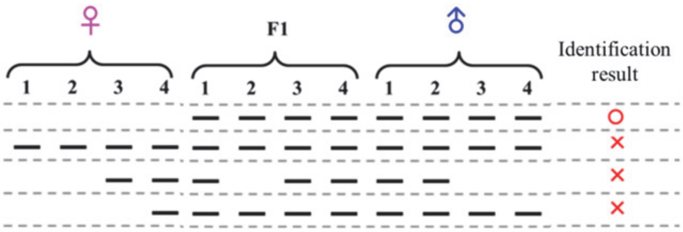

Fig. 1. The principle of F_1 hybrids identification. The horizontal lines show the bands amplified by molecular markers.

擁有的條帶，即使父本的全部樣本都有出現此條帶，此條帶亦不足以判斷子代是有發生雜交的情形。反之，如果在父本出現的條帶，子代有而母本完全沒有出現，則可以判斷子代發生雜交(Fig. 1)。後續試驗均將依據上面的方法，在人工雜交的子代分析結果中選擇可用做判斷的多型性條帶。所有的雜交組合，都會使用七種引子組合進行分析之後觀察結果，找出可供判別的多型性條帶。

流式細胞儀分析(FCM)，將採收種子分別播於穴盤，待植株達 15 cm 高時，取新芽之第一片展開葉約 1 cm^2 葉片，加入 0.2 mL UV CyStain Precise T 萃取緩衝液 A (100 mL deionized water、2.1 g citric acid、0.5 g Tween 20)。以刀片將組織切碎過濾，再於濾液中添加 0.8 mL Partec Cystain Precise T 緩衝液 B [100 mL deionized water、7.9 g dibasic sodium phosphate、0.5 mL DAPI (4, 6-diamino-2-phenylindole) stock (4.55 mg 40、60-diamidino-2-phenylindole、10 mL deionized water)]，靜置染色 3 min。以流式細胞儀 (Flow Cytometry, Partec PA, Germany)分析系統，檢測 2,500 個細胞核，分析細胞內之核酸含量(Matthew *et al.* 2002)。

六、田間自然授粉種子之田區設計及栽培管理

試驗以 *B. napus* 品種「德雜油 18 號」模擬 GM 花粉貢獻親，其為隱性細胞核雄不稔兩系雜交品種 (recessive genetic male sterility double cross variety)，以 *B. rapa*「農興 80 天」作為花粉接受親，其為臺灣地區主要種植的綠肥油菜品種。種植於行政院農業委員會農業試驗所(Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan)，田區配置將花粉貢獻親配置於田區中段，花粉貢獻親之上風與下風處種植花粉接受親，且花粉貢獻親和接受親完全相接。花粉接受親田區長度為 13 m，花粉貢獻親長度為 10 m，花粉貢獻親和花粉接受親面積比例為 0.384 (Fig. 2)。幼苗期之處理與 SRAP 親本分析之處理相同，待幼苗茁壯後，移入田間種植，種植於寬 1 m 的平畦，雙行植，行距為 0.3 m，株距為 0.35 m，種植密度約為 8 pl m^{-2}。

結果

一、以流式細胞儀判斷親代及雜交子代細胞核酸含量

本試驗中所使用到的 *B. napus* 品種「德雜油 18 號」以及 *B. rapa*「農興 80 天」以流式細胞儀進行親代細胞內的核酸含量的分析，了解各親本細胞內的核酸含量，並在後續試驗中亦對子代進行流式細胞儀的試驗，希望所的到的子代核酸含量介於兩親本之間。

Fig. 3 為流式細胞儀所得之分析結果，圖片縱軸為量測細胞核個數，橫軸為螢光強度。可觀察到每個樣本在分析結果中皆呈現兩個較高的峰值，第一個出現的峰值為樣本在 G1 時期所呈現的螢光強度讀值，第二個波峰則表示在 G2 時期出現的螢光強度讀值。藉此可明顯觀察到「農興 80 天」之螢光強度讀值約在 50 與 100，而「德雜油 18 號」之螢光

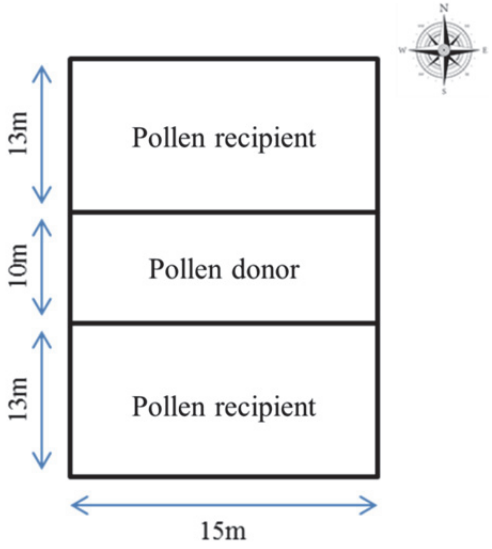

Fig. 2. Field design of the experiment at Taiwan Agricultural Research Institute.

強度讀值約在 110 與 220 左右，兩者相差約兩倍，推論「德雜油 18 號」之細胞內的核酸含量約為「農興 80 天」之細胞內的核酸含量的兩倍。

如與親代試驗結果比較發現，「農興 80 天」之螢光強度平均值約在 50 左右，「德雜油 18 號」之螢光強度平均值約在 110 左右，而子代所表示的光譜讀值則約在 70–80 左右 (Fig. 4)。又發現在雜交子代細胞內的核酸含量，皆介於兩親本之間，說明以「農興 80 天」為母本、「德雜油 18 號」為父本，所產生的雜交子代可以應用流式細胞儀進行鑑別。

二、以外表型判斷親代及雜交子代差異

應用流式細胞儀對細胞核酸含量進行雜交後代和母本之間差異性鑑別之後，接著觀察外表型表現，以了解子代是否可以產生和親本不同的表現。因此，針對生長期約 4 至 5 葉期的兩親本與子代植株進行照相比對。將雜交子代植株和親本放置一起分別拍攝正向圖、鳥瞰圖和單一葉片的比較圖如 Fig. 5。

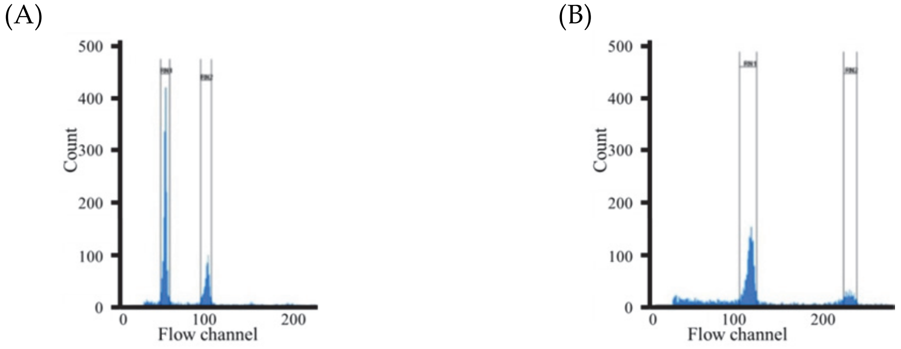

Fig. 3. The flow cytometry data of (A) 'Nongxing 80 days' and (B) 'Deza oil No.18'.

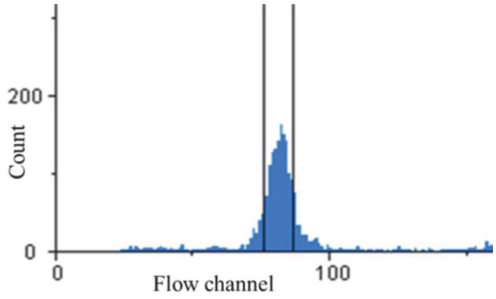

Fig. 4. The chromosome analysis of 'Nongxing 80 days' × 'Deza oil No. 18'.

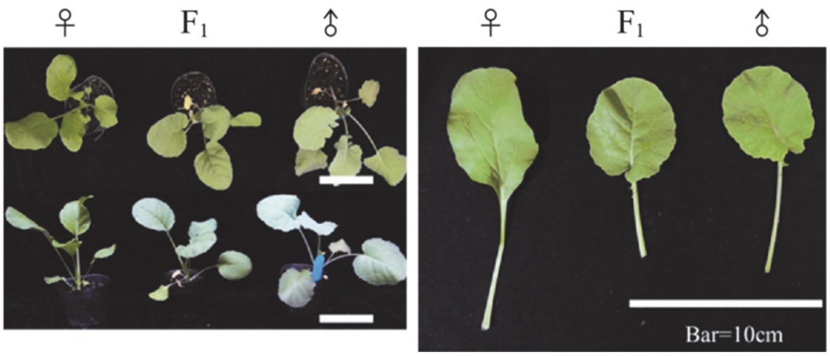

Fig. 5. The plants of 'Nongxing 80 days' × 'Deza oil No. 18' from side and upper views, and single leaf comparison between hybrids and parental plants.

結果發現親本「農興 80 天」植株，葉緣較為平滑，葉片較細緻而且較薄，葉型為長橢圓形或有些接近圓形，葉片顏色較翠綠；而「德雜油 18 號」植株，葉緣皆呈現鋸齒狀，葉片較為厚實，且葉面帶有蠟質，葉形接近圓形，葉片下緣有多片小裂葉出現。另觀察雜交子代與親本外表型的差異，可發現雜交子代葉片外觀與「德雜油 18 號」較為相近，葉緣鋸齒雖不如「德雜油 18 號」般明顯，但是基本上可以觀察到有鋸齒狀葉緣的呈現，葉片基部都有小裂葉的出現。葉色部分則呈現較混亂的情形，較難以區分。葉形部分則全部接近「德雜油 18 號」的圓形葉片，葉片表面的蠟質則不明顯。

三、利用 SRAP 分析親本與雜交子代之結果

1. 分析親本基因多型性結果

因為油菜基因組之 DNA 序列差異性仍未知，所以在同品種的油菜(*B. rapa* and *B. napus*)個體間均可能會產生不同程度的差異性。為了排除這些差異性對判斷後代是否發生雜交所造成的影響，需先對親本進行其內部的多型性分析，以了解親本內部的基因多型性。因此，由「德雜油 18 號」及「農興 80 天」中，各選擇 30 株樣本進行親本內的歧異度分析。首先，對「農興 80 天」進行 SRAP 分析，可以發現在同一組引子組合中呈現的多型性結果中，有些樣本間的歧異度非常大，有部分的樣本則表現出相似的條帶。不同引子組合會在親本間產生不同的條帶。在各引子組合中，也分別增幅出不同數量的一致性條帶，七組使用的引子組合中，共找出 13 個可清楚辨識的一致性條帶，其中又以引子組合 5-3 最多，引子組合 3-5 則沒有發現，其餘引子組合皆有兩個一致性的條帶(Table 2)。而在「德雜油 18 號」為樣本的 SRAP 分析結果觀察，在使用的七組引子組合中，總共產生了 27 個一致性條帶。

由 Table 2 可發現，所使用的引子組合在品種內部的歧異度上，不同的引子組合會產生不同的結果。發現在同一組引子組合中呈現的結果中，有些可在同品種之不同樣本間，呈現明顯的多型性，而在「德雜油 18 號」

Table 2. Using different SRAP primers to analyze *B. napus* and *B. rapa*.

No.	*B. rapa* 'Nongxing 80 days'	*B. napus* 'Deza oil No.18'
1-5-1500	0	*
1-5-1100	*	*
1-5-900	27	*
1-5-750	0	*
1-5-450	17	*
1-5-400	*	29
1-5-300	0	*
2-6-750	0	*
2-6-600	*	*
2-6-400	*	*
3-5-900	10	*
3-6-1100	0	*
3-6-900	*	0
3-6-700	0	*
3-6-550	23	*
3-6-400	*	20
3-6-350	10	*
5-1-1300	25	*
5-1-1000	*	0
5-1-900	11	*
5-1-700	13	*
5-1-550	*	28
5-1-400	0	*
5-3-1300	0	*
5-3-1000	*	*
5-3-900	0	*
5-3-700	*	0
5-3-600	0	*
5-3-450	*	*
5-6-1000	0	*
5-6-800	25	*
5-6-600	28	*
5-6-550	*	*
5-6-450	*	27

* Means that all of the samples (30) show the same bands. The number means that how many samples show that bands.
The No. 1-5-1500 means that primer pairs 1-5 were used to analyze samples and the polymorphism bands show at 1500 bp.

內的歧異度較小。此部份之總結如次：「農興80 天」中在多型性條帶數量的呈現上並不少於「德雜油 18 號」中所增幅出的條帶數目，但是在歧異度的部分，「德雜油 18 號」中樣本呈現的不同多型性條帶數量少於「農興 80 天」中樣本所呈現的數量。顯示「農興 80 天」內部的 SRAP 歧異度大於「德雜油 18 號」內部的歧異度，可能原因應是「農興 80 天」多為開放授粉品種所造成。

2. 分析雜交子代之多型性結果

雜交子代多型性分析所使用的引子組合，包含 1-5、2-6、3-5、3-6、5-1、5-3、5-6 等 7 組。以下針對以父母本和雜交子代一起進行分析比較，分別在每個親本品種之中挑選 4 個樣本作為之後判斷是否為雜交子代的依據。因為親本品種內的基因型本身存在差異，所以挑選的 4 個樣本中，包含在親本分析試驗中 30 個樣本出現的所有多型性條帶，以防止在子代的時候發生誤判。以「農興 80 天」為例，在 30 個分析樣本中會挑選出 4 個可以將分析結果中所有條帶皆能包含在內的 4 個樣本，進行子代是否發生雜交的分析 (Fig. 6)。

當以引子組合 1-5 分析雜交子代，結果發現只在約 1500 bp 的位置出現一組可辨別的條帶。在引子組合 2-6 的分析結果，亦僅在 750 bp 的位置出現一組可辨別條帶。而使用第三組引子組合 3-5 分析的結果，只有在約 600 bp 的位置有一個可辨別條帶。第四組引子組合 3-6 的分析結果，「農興 80 天」與「德雜油 18 號」的雜交子代中，出現了 3 組可以辨別的條帶，分別位於 1100、700 及 450 bp 的位置。使用引子組合 5-1 所分析的結果中，只在 400 bp 的位置有可辨別條帶。繼續探討以引子組合 5-3 所呈現的可辨別條帶，位於約 1300、900 及 600 bp 的位置。而以引子組合 5-6 所分析的結果，並未觀察到可以清楚判斷的條帶(Fig. 7)。

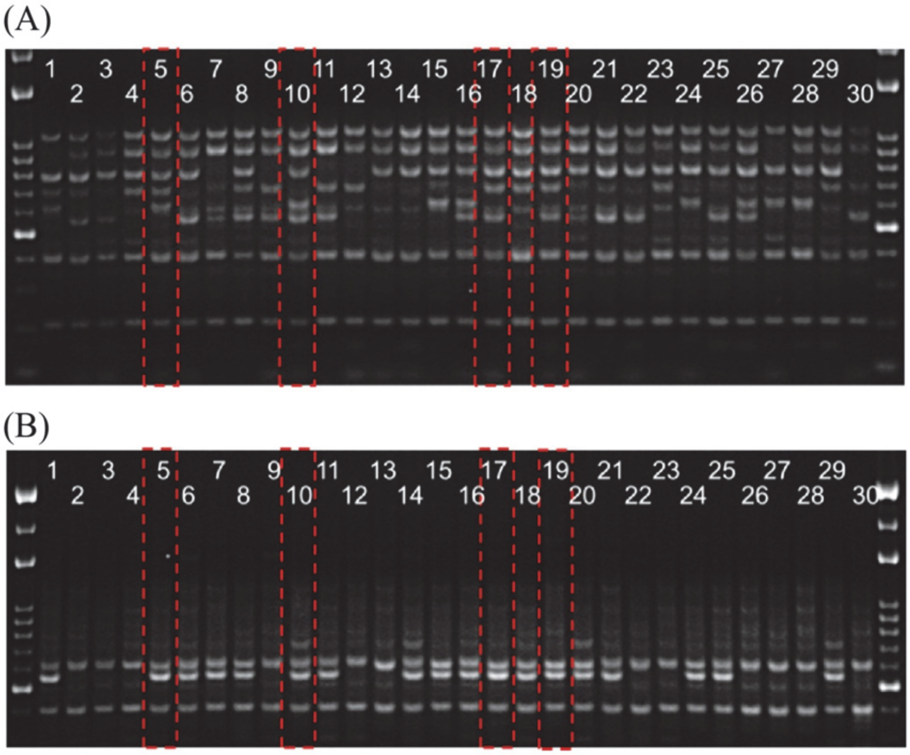

Fig. 6. For *B. rapa* 'Nongxing 80 days', the numbers in red frame represent the samples for the hybrid selection experiment by using primer pairs (A) 1-5 and (B) 2-6.

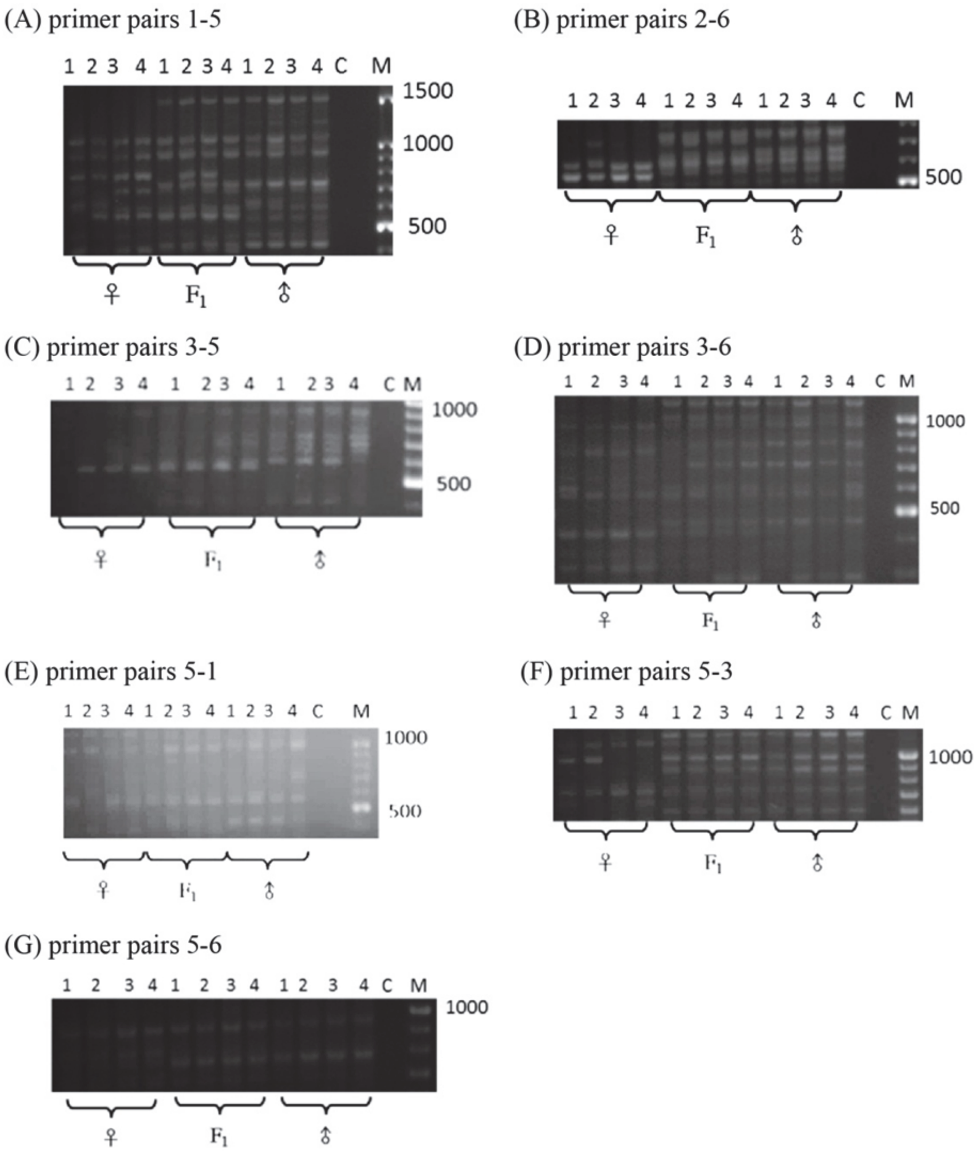

Fig. 7. Using SRAP marker to distinguish the hybrids of 'Nongxing 80 days' and 'Deza oil No. 18'. (A) Primer pairs 1-5; (B) primer pairs 2-6; (C) primer pairs 3-5; (D) primer pairs 3-6; (E) primer pairs 5-1; (F) primer pairs 5-3; and (G) primer pairs 5-6.

綜合所有的引子組合所分析的雜交子代結果中，發現在引子組合 5-6 所呈現的可辨別條帶為最少，引子組合 3-6 及 5-3 呈現的可辨別條帶數較多。

一、田間試驗

為了探討田間實際狀況，將「農興 80 天」和「德雜油 18 號」分別種植於田間，使其在自然的狀況下產生雜交後代。試驗是以「農興 80 天」作為母本並進行後代種子的蒐集，將蒐集到的後代種子種植於穴盤中，待其成長至 3、4 葉期後，對子代葉片及親本葉片進行外表型態觀察，並且以 SRAP 進行分析。

由觀察人工雜交的子代及兩親代葉片外表型後，發現如子代有雜交發生，則其葉緣部分會呈現鋸齒狀，部分植株葉片基部也有

小裂葉產生。相較於母本「農興 80 天」光滑葉緣型態上，較為接近父本「德雜油 18 號」的葉片外觀型態。而由田間試驗所蒐集到的種子，也呈現相同特徵(Fig. 8)。因此，先假設這些種子發生了雜交。

基於這個假說，對於在田間蒐集「農興 80 天」植株上的油菜種子，種植後根據葉片外表型篩選可能的雜交植株，並依據對前述人工雜交種子的分析方法進行 SRAP 分析，以觀察基因型和外表型是否呈現一致的結果。共使用 1-5、2-6 及 5-1 三組引子組合進行分析，在對由田間所蒐集到種子的基因多型性分析結果，可發現在引子組合 1-5 中能清楚判斷的條帶位於 1500 bp 的位置 (Fig. 9)。據此與前述人工雜交後代分析的結果相對照，發現和人工雜交種子所呈現的可辨別條帶一致。

而根據田間試驗外表型和基因型的分析結果，與人工雜交種子的試驗結果比對，可以發現由外表型上進行雜交種子的判定上，會跟由基因型來判定時具有相同的結果(Fig. 9)。因此，未來在實際田間的應用上，可以先以葉片外觀進行判斷，但若因人為判斷上有爭議，則可另以 SRAP 或是流式細胞儀進行鑑別，以準確判定植株是否為雜交後代。

討論

臺灣曾引進 *B. napus* 進行馴化，希望可以用作替代能源，假如未來如有必要引進 GM *B. napus* 在臺灣種植，則無法確定 GM *B. napus* 對臺灣冬季裡作 *B. rapa* 會造成什麼影響。而在臺灣有關油菜的相關試驗中，尚未有可供偵測油菜(*B. rapa* and *B. napus*)間發生基因流動的外觀型態或分子標誌。因此，本試驗選擇不同品種的油菜，分屬 AACC 基因組的 *B. napus* 及屬於 AA 基因組的 *B. rapa* 作為試驗材料，以人工授粉的方式取得雜交後代，觀察兩種物種間的種間雜交情形，以及雜交後代在基因型及外觀上與親代的差異性，並配合流式細胞儀進行分析比較。觀察以 *B. rapa* 為母本的雜交試驗分析結果，希望藉此找出可供偵測之標誌。

Fig. 8. The Brassica lines and hybrids used in this experiment. (A) 'Nongxing 80 days'; (B) 'Deza oil No. 18'; and (C) 'Nongxing 80 days' × 'Deza oil No. 18'.

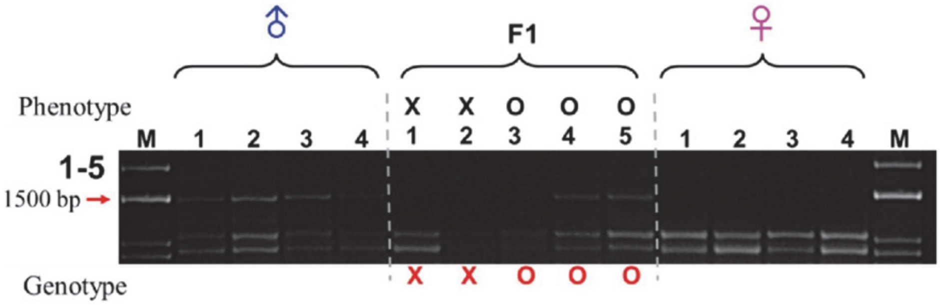

Fig. 9. The F_1 hybrid analysis: 'Nongxing 80 days' × 'Deza oil No. 18'. O: non-hybrid. ×: hybrid.

「農興 80 天」的基因組為 AA (AA, 2n = 20)，而「德雜油 18 號」的基因組為 AACC (AACC, 2n = 38)，兩者雜交後代基因組應為 AAC。在細胞內的核酸含量方面，「德雜油 18 號」因為染色體數將近「農興 80 天」的 1 倍，所以在細胞內的核酸含量「德雜油 18 號」應該約為「農興 80 天」的 1 倍，而雜交後代的含量則應介於兩者之間。流式細胞儀為常見可針對細胞染色體進行分析與分選的技術，主要透過雷射光或 UV 照射位於流體上的顆粒(細胞)，藉由分析光源激發後的螢光訊號，對於待測細胞性質差異進行量化。例如，其可分析細胞核酸含量與染色體組成比較。Matthew *et al.* (2002)曾以流式細胞儀方式比較 *B. napus* 與 *B. rapa* 雜交後代之細胞核酸含量，結果發現雜交後代核酸含量介於 *B. napus* 與 *B. rapa* 之間(Matthew *et al.*, 2002)。Chiou *et al.* (2012)也曾在芥藍與油菜種間雜種的獲得與鑑定的研究中，利用流式細胞儀進行 *B. oleracea* 和 *B. rapa* 雜交後代的鑑別，發現在雜交子代的核酸含量介於兩親本之間(Chiou *et al*. 2012)。因此，利用流式細胞儀進行「德雜油 18 號」、「農興 80 天」與其雜交後代之鑑別實為可行。

一般而言，「農興 80 天」品種植株葉緣較為平滑，葉片較細緻而且較薄，葉型為長橢圓形或接近圓形，葉片顏色較翠綠；而在「德雜油 18 號」植株，葉緣呈現鋸齒狀，葉片較為厚實，且葉面帶有蠟質，葉型接近圓形，葉片下緣有多片小裂葉出現。在比較後代和親本的外表性狀後，可以發現所有雜交組合的雜交子代所產生的性狀中，在葉緣部分都出現傾向於父本「德雜油 18 號」的情形，葉片基部也都有小裂葉出現，葉片也較農興 80 天品種厚。但是，在葉色部分卻沒有差異，葉面雖有蠟質但卻不如父本明顯。但有研究指出，蕓苔屬中的油脂含量和種皮顏色等遺傳性狀，會受授粉母本細胞質的影響。在葉片部分，Chiou *et al*. (2012)在進行 *B. oleracea* 和 *B. rapa* 的雜交試驗後，確實觀察到兩者正反交的雜交後代在葉片質地及葉色有偏向母本的情形。推測可能是因為「德雜油 18 號」配子細胞的基因組為 AC，比「農興 80 天」配子細胞中多了 C 基因組的基因，因此正反交的後代植株在葉緣部分表現明顯的鋸齒和在葉片基部有小裂葉呈現。

而因為所選擇的「農興 80 天」為開放授粉品種，且「德雜油 18 號」的基因組複雜程度未知。為確保所採用辨別後代的條帶的效力，本試驗根據 Cohen (1992) 文中之建議，在 power 為 0.8 的情況下，設定 α 為 0.05 時，最少的必須樣本數為 30。故從所購得的種子中，取 30 個種子進行之後所有的試驗分析。

本研究中利用 SRAP 分析後，可以發現在「農興 80 天」經 SRAP 分析後歧異度相對於「德雜油 18 號」歧異度大，但在品種內一致呈現的多型性條帶數量卻不因此而減少。因此可推測這些條帶應是不同品種間特有的條帶。

在與雜交後代一起比較，以尋找可辨別的多型性條帶的結果中發現，7 組引子組合中，各引子組合呈現的可辨別多型性條帶數目不同，以引子組合 3-6 和 5-3 中相對增幅出較多的多型性條帶，但也因為條帶排列較緊密，可能會影響判斷。而引子組合 1-5、2-6、5-1，雖然在可辨別條帶數量尚不及上述 3 個引子組合，但是條帶間的間距較大，所以在條帶區分上較清楚。而引子組合 5-6，則沒有發現可辨別條帶。SRAP 包含 30 組引子組合，未來可在選擇其餘引子組合進行分析，找尋出更多可用於判斷雜交後代之條帶。

為了模擬田間狀況，以「德雜油 18 號」及「農興 80 天」進行試驗，之後收集「農興 80 天」的種子種植，先以觀察葉片來判定雜交與否，再利用 SRAP 進行分析確認。結果證實，試驗中所有受測後代種子，在以葉片外觀判定之結果，與進行人工雜交後代所得到的分析結果一致。因此，觀察葉緣鋸齒，可為判斷有無雜交之有效方法。惟本試驗中

所觀察之樣本只有 5 株，不足以建立在實際情形之下 SRAP、流式細胞儀和葉片外表型觀察三者間之相關性。因此，未來試驗方向可以先建立葉片外觀型態判斷準則的具體量化數據，將文中可供偵測之 SRAP 條帶進行更進一步分析，找出 2 至 3 組具專一性之大油菜條帶供判斷之用，並以建立起基因型、流式細胞儀以及外表型態之關聯性為目標，經二項分布公式估計後的，可以先採集約 150 顆自然授粉之種子，分別進行三種試驗方式之分析。

本研究目的在於找出「德雜油 18 號」及「農興 80 天」與其雜交後代的差異性，期望在未來若有 GM *B. napus* 引進臺灣，並且在田間同時種植時，可以提供一個可有效辨別是否發生雜交的方式，以確實監控田間基因的流動情形。因此，研究中先比對雜交子代在流式細胞儀及外表型態上的差異，並藉由 SRAP 確認在基因組當中亦存在可辨別的條帶，來證實外表型上的差異性並非因為環境影響，因此型態差異在野外大規模的調查中是可被應用。而從試驗結果可知，人工雜交後代，無論在基因組及在植株葉片外觀上，皆與母本存在差異性。且藉由田間實驗所蒐集到種子加以驗證，證實不論是人工或自然受粉的雜交後代在 SRAP、流式細胞儀和葉片外表型之觀察上，均可當成判別是否發生雜交的方法。由於 SRAP 和流式細胞儀的試驗過程相對較為複雜，且較耗時，因此建議在未來在田間調查部分，可先對植株葉片外觀進行判斷，對有疑問之植株則可再利用流式細胞儀及 SRAP 試驗加以確認。

引用文獻

Chiou CC, TK Lin, CY Lin, CN Hsia, ST Wang (2012) Identification of interspecific hybrids from crosses between *Brassica oleracea* and *B. campestris*. **J. Taiwan Agric. Res.** 61:52–63。

Cellini F, A Chesson, I Colquhoun, A Constable, HV Davies, KH Engel, AMR Gatehouse, S Kärenlampi, EJ Kok, JJ Leguay, S Lehesranta, HPJM Noteborn, J Pedersen, M Smith (2004) Unintended effects and their detection in genetically modified crops. **Food Cosmet. Toxicol.** 42:1089–1125.

Cohen J (1992) A Power Primer. **Psycholog. Bullet.** 112:155–159.

Colton B, T Potter (1999) History. Chapter 1. p.1–4, *In*: Canola in Australia: the first thirty years. Salisbury PA, TD Potter, G McDonald, AG Green (Eds.) Organising Committee of the 10th International Rapeseed Congress, Canberra.

Daniell H (2002) Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. **Nat. Biotechnol.** 20:581–586.

Doyle JJ, JL Doyle (1987) A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. **Phytochem. Bull.** 19:11–15.

FitzJohn RG, TT Armstrong, LE Newstrom-Lloyd, AD Wilton, M Cochrane (2007) Hybridisation within Brassica and allied genera: evaluation of potential for transgene escape. **Euphytica** 158:209–230.

Gasson MJ (2000) Gene transfer from genetically modified food. Curr. Opin. **Biotech.** 11:505–508.

Groves RH, JR Hosking, GN Batianoff, DA Cooke, ID Cowie, RW Johnson, GJ Keighery, BJ Lepschi, AA Mitchell, M Moerkerk, RP Randall, AC Rozefelds, NG Walsh, BM Waterhouse (2003) Weed categories for natural and agricultural ecosystem management. Bureau of Rural Sciences, Canberra, Australia.

Hansen G, MS Wright (1999) Recent advances in the transformation of plants. **Plant Sci.** 4:226–231.

Li G, CF Quirous (2001) Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. **Theor. Appl. Genet.** 103:455–461.

Matthew DH, RJ Millwood, PL Raymer, CN Stewart (2002) Bt-transgenic oilseed rape hybridization with its weedy relative, *Brassica rapa*. **Environ. Biosafety Res.** 1:19–28.

Schlötterer C (2004) The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? **Nat. Rev. Genet.** 5:63–69.

Treu R, J Emberlin (2000) Pollen dispersal in the crops Maize (*Zea mays*), Oil seed rape (*Brassica napus* ssp *oleifera*), Potatoes (*Solanum tuberosum*), Sugar beet (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*) and Wheat (*Triticum aestivum*). National Pollen Research

Unit, University Of Worcester, UK. 54 pp.

Uzogara SG (2000) The impact of genetic modification of human foods in the 21st century: A review. **Biotechnol. Adv.** 18:179–206.

Wang YP, K Sonntag, E Rudloff, J Han (2005) Production of fertile transgenic *Brassica napus* by *Agrobacterium*-mediated transformation of protoplasts. **Plant Breed.** 124:1–4.

Weekes R, T Allnutt, C Boffey, S Morgan, M Bilton, R Daniels, C Henry (2007) A study of crop-to-crop gene flow using farm scale sites of fodder maize (*Zea mays*L.) in the UK. **Transgen. Res.** 16:203–211.

－編輯：楊純明